






LUCIFERASES

Publication number: JP9510610 (T)	Also published as:
Publication date: 1997-10-28	 WO9525798 (A1)
Inventor(s):	 US6132983 (A)
Applicant(s):	 RU2192467 (C2)
Classification:	 NO319706 (B1)
- international: C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N15/53; C12N5/10; C12N9/02; C12Q1/66; C12Q1/68; G01N33/50; C12R1/19; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/09; C12N15/53; C12N5/10; C12N9/02; C12Q1/66; C12Q1/68; G01N33/50; (IPC1-7): C12N1/21; C12N1/21; C12N15/09; C12N5/10; C12N9/02; C12N9/02; C12Q1/66; C12Q1/68; C12R1/19; C12R1/19; G01N33/50	 JP2010088440 (A)
- European: C12N9/02K	more >>
Application number: JP19950524486T 19950322	
Priority number(s): GB19940005750 19940323; GB19950001170 19950120; WO1995GB00629 19950322	

Abstract not available for JP 9510610 (T)
 Abstract of corresponding document: **WO 9525798 (A1)**
 Proteins are provided having luciferase activity with greater heat stability than wildtype luciferases by replacing the glutamate equivalent to that at position 354 of Photinus pyralis luciferase or 356 of Luciola luciferases with an alternative amino acid, particularly lysine. DNA, vectors and cells that encode for and express the proteins are also provided as are test kits and reagents for carrying out luminescence assays using the proteins of the invention. Preferred proteins have a second replaced amino acid at a position equivalent to position 215 of Photinus pyralis luciferase or 217 of Luciola luciferases.

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-510610

(43) 公表日 平成9年(1997)10月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/21		9282-4B	1/21	
5/10		9359-4B	9/02	
9/02		7823-4B	C 1 2 Q 1/66	
C 1 2 Q 1/66		7823-4B	1/68	A
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 45 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号	特願平7-524486	(71) 出願人	イギリス国
(86) (22) 出願日	平成7年(1995)3月22日		イギリス国、ハンブシャー・ジー・ユー・
(85) 翻訳文提出日	平成8年(1996)9月20日		14・6・テイ・デイ、フアーンボロー、デ
(86) 国際出願番号	P C T / G B 9 5 / 0 0 6 2 9		イフエンス・イバリユエイション・アン
(87) 国際公開番号	W O 9 5 / 2 5 7 9 8		ド・リサーチ・エージェンシー (番地なし)
(87) 国際公開日	平成7年(1995)9月28日	(72) 発明者	ロウ、クリストファー・ロビン
(31) 優先権主張番号	9 4 0 5 7 5 0 . 2		イギリス国、ケンブリッジシャー・シー・
(32) 優先日	1994年3月23日		ビー・2・1・キュー・テイ、ケンブリ
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		ッジ、テニス・コート・ロード、ユニバー
(31) 優先権主張番号	9 5 0 1 1 7 0 . 6		シテイ・オブ・ケンブリッジ (番地なし)
(32) 優先日	1995年1月20日	(74) 代理人	弁理士 川口 義雄 (外3名)
(33) 優先権主張国	イギリス (G B)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ルシフェラーゼ

(57) 【要約】

Photinus pyralis ルシフェラーゼの354位またはLuciola 属ルシフェラーゼの356位に位置するグルタミン酸と同等のグルタミン酸を代替アミノ酸、特にリシンで置換することにより、野生型ルシフェラーゼよりも高い熱安定性をもったルシフェラーゼ活性保有タンパク質を提供する。本発明のタンパク質をコードし、また発現させるDNA、ベクター及び細胞、並びに本発明のタンパク質を用いる発光アッセイの実施のための試験キット及び試薬も提供する。好ましいタンパク質は、Photinus pyralis ルシフェラーゼの215位またはLuciola 属ルシフェラーゼの217位と同等の位置に第二の置換アミノ酸を有する。

【特許請求の範囲】

1. ルシフェラーゼ活性を有し、かつ *Photinus pyralis*、*Luciola mingrellica*、*Luciola cruciata* または *Luciola lateralis* 由来のルシフェラーゼに対して60%を越えるアミノ酸配列相同性を有するタンパク質であって、*Photinus pyralis* ルシフェラーゼの残基354または *Luciola mingrellica*、*Luciola cruciata* 及び *Luciola lateralis* ルシフェラーゼの残基356に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸以外のアミノ酸であることを特徴とするタンパク質。

2. アミノ酸配列 X G D D K P G A を含み、この配列中の X はグルタミン酸以外のアミノ酸残基であることを特徴とする請求項1に記載のタンパク質。

3. アミノ酸配列 T P X G D D K P G A を含み、この配列中の X はグルタミン酸以外のアミノ酸残基であることを特徴とする請求項2に記載のタンパク質。

4. アミノ酸 X がグリシン、プロリンまたはアスパラギン酸でないことを特徴とする請求項1から3のいずれか1項

に記載のタンパク質。

5. アミノ酸 X がトリプトファン、バリン、ロイシン、イソロイシン及びアスパラギンのうちのいずれかであるか、またはこれらのアミノ酸のうちのいずれかの類似体または修飾体であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載のタンパク質。

6. アミノ酸 X がリシン及びアルギニンのいずれか一方であるか、またはこれらのアミノ酸の類似体または修飾体であることを特徴とする請求項1から3のいずれか1項に記載のタンパク質。

7. 配列番号2に示したアミノ酸配列を含み、前記配列中の X a a は請求項5または6に記載のアミノ酸またはその類似体もしくは修飾体であるタンパク質。

8. 請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質をコードするDNA。

9. 配列番号1に示したヌクレオチド配列を含み、前記配列の1063～1065位の3個の塩基 N はグルタミン酸以外のアミノ酸をコードするコドンを構成す

ることを特徴とする請求項8に記載のDNA。

10. 前記コドンが請求項5または6に記載のアミノ酸、

類似体または修飾体をコードすることを特徴とする請求項9に記載のDNA。

11. 請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質をコードするluc遺伝子を含むベクター。

12. 野生型または組み換えluc遺伝子を含むベクターを、*Photobacterium luminescens*ルシフェラーゼの354位のグルタミン酸または*Luciola mingrellica*、*Luciola cruciata*もしくは*Luciola lateralis*ルシフェラーゼの356位のグルタミン酸をコードするコドンで代替アミノ酸、該アミノ酸の類似体、または該アミノ酸の修飾体をコードするコドンに変更する部位特異的突然変異誘発によって処理することにより取得可能であることを特徴とする請求項11に記載のベクター。

13. 代替アミノ酸が請求項5または6に記載のアミノ酸、類似体または修飾体であることを特徴とする請求項12に記載のベクター。

14. 内部にluc遺伝子が連結された、pKK223-3、pDR540及びpT7-7の中から選択されることを特徴とする請求項9から13のいずれか1項に記載のベ

クター。

15. 請求項8から14のいずれか1項に記載のDNAまたはベクターを保有する、請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質を発現させ得る細胞。

16. 大腸菌、*S. cerevisiae*または昆虫細胞であることを特徴とする請求項15に記載の細胞。

17. ATP測定によるアッセイを実施するための試験キットであって、発光試薬中に存在する請求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質を含むことを特徴とするキット。

18. 光を発生するルシフェリン及びルシフェラーゼを用いてATPを測定するアッセイ方法であって、前記光の量はATPの量に関連し、ルシフェラーゼが請

求項1から7のいずれか1項に記載のタンパク質であることを特徴とする方法。

19. アッセイを30～70℃の温度で行なうことを特徴とする請求項18に記載の方法。

20. アッセイを37～60℃の温度で行なうことを特徴とする請求項18に記載の方法。

21. アッセイを40～50℃の温度で行なうことを特徴

とする請求項18に記載の方法。

22. 熱安定化剤の不在下に室温で10日間貯蔵後にそのルシフェラーゼ活性を85%以上維持しているルシフェラーゼ調製物。

23. 請求項1から7のいずれか1項または請求項22に記載のルシフェラーゼの、特異的結合試薬のためのラベルとしての使用。

24. 請求項1から7のいずれか1項に記載のルシフェラーゼで標識した特異的結合試薬を含むことを特徴とする試験キット。

25. 細胞またはDNAの同定のための、請求項8から14のいずれか1項に記載のルシフェラーゼコーディングDNAまたはベクターの使用。

【発明の詳細な説明】

ルシフェラーゼ

本発明は、ルシフェラーゼ活性を有する新規なタンパク質、及び該タンパク質の発現をコードするDNA及びベクターに係わる。本発明は特に、30℃を越える温度下で熱安定性を有するルシフェラーゼを提供する。

ホタルルシフェラーゼは、ATP、 Mg^{2+} 及び酸素分子の存在下にルシフェリンの酸化を触媒し、その結果光を発生させる。この反応の量子収率は約0.88であり[DeLuca及びMcElroy(1978)並びにSeligier及びMcElroy(1960)参照]、上記発光特性はATPレベルを測定する発光測定(luminometric)アッセイで用いられている。

ルシフェラーゼはホタルまたはツチボタルといった昆虫の体から直接取得可能であり、あるいはまた該酵素をコードする組み換えDNA構築物を保有する微生物からの発現によって取得可能である。この酵素を取得できる、またはこの酵素をコードするDNAを得ることができる四つの重要なホタル種は、日本のゲンジボタル*Luciola cruciata*及びヘイケボタル*Luciola lat*

eralis、東ヨーロッパのホタル*Luciola mingrelica*、並びに北アメリカのホタル(*Photinus pyralis*)である。ツチボタル*Lampyris noctiluca*もルシフェラーゼ供給源の一つであり、そのルシフェラーゼのアミノ酸配列は*Photinus pyralis*のものに対して84%の相同性を有する。

野生型ルシフェラーゼ及び組み換えルシフェラーゼの熱安定性は、これらのルシフェラーゼを30℃を越える、特に35℃より高い温度に曝露するとその活性がきわめて急激に失われるようなものである。このような不安定性は、上記酵素を高い周囲温度の下で使用もしくは貯蔵する場合、または加熱によって反応速度を高めなければならない場合当該酵素の欠点となる。日本ホタルのルシフェラーゼをその217位において突然変異させてトレオニン残基をイソロイシン残基によって置換すれば該ルシフェラーゼを熱失活に対して安定化できることが知られ

ている (K a j i y a m a 及び N a k a n o , B i o c h e m i s t r y 32, p p . 13795-13799, 1993)。上記のようにして、酵素の熱及びpH安定性並びに比活性

が高められた。P h o t i n u s p y r a l i s 及び L u c i o l a m i n g r e l i c a の熱安定化は未だ報告されていない。

本発明者はここに、P h o t i n u s p y r a l i s、L u c i o l a m i n g r e l i c a、L u c i o l a l a t e r a l i s 及び L u c i o l a c r u c i a t a のいずれもが保存する配列中に存在するグルタミン酸 (g l u t a m a t e) 残基を代替アミノ酸、特にリシンまたはアルギニンで置換することによって、野生型ルシフェラーゼより高い熱安定性を有する新規なルシフェラーゼを提供する。上記グルタミン酸は P h o t i n u s p y r a l i s ルシフェラーゼの354位に見出されるもので、前記種及び他の種のルシフェラーゼに見出される保存アミノ酸配列 T P E G D D K P G A の3番目のアミノ酸である。

即ち、本発明はその第一の態様において、ルシフェラーゼ活性を有するタンパク質で、P h o t i n u s p y r a l i s、L u c i o l a m i n g r e l i c a、L u c i o l a c r u c i a t a または L u c i o l a l a t e r a l i s のそのようなタンパク質に対して60%

を越えるアミノ酸配列相同性を有するタンパク質を提供しこのタンパク質は P h o t i n u s p y r a l i s ルシフェラーゼの残基354または L u c i o l a m i n g r e l i c a、L u c i o l a c r u c i a t a 及び L u c i o l a l a t e r a l i s ルシフェラーゼの残基356に対応するアミノ酸残基がグルタミン酸以外のアミノ酸であることを特徴とする。

上記アミノ酸は天然アミノ酸であっても、また天然アミノ酸の修飾体や天然アミノ酸の類似体といったいわゆる非一般的アミノ酸であってもよい。グルタミン酸以外のアミノ酸の類似体とは、タンパク質への作用において元のアミノ酸と同等である化合物のことであると理解される。典型的な非一般的アミノ酸は、“U

S and European Patent in Manuals and the Rules of Practice in Patent Cases: application disclosures containing nucleotide and/or amino acid sequences: modified and unusual amino acids” に示されているものである。

る。

好ましくは、本発明のタンパク質はアミノ酸配列X G D D K P G Aを含み、この配列中のXはグルタミン酸以外のアミノ酸であることを特徴とする。更に好ましくは、本発明のタンパク質はアミノ酸配列T P X G D D K P G Aを含み、その際Xは熱安定性の観点から、アスパラギン酸、プロリンまたはグリシン以外の任意のアミノ酸であることが好ましい。更に好ましくは、Xはトリプトファン、バリン、ロイシン、イソロイシンまたはアスパラギンであるが、リシンもしくはアルギニンまたはそのいずれかの類似体であれば最も好ましい。

上記保存T P X G D D K P A領域中1個または2個のアミノ酸が相違するルシフェラーゼを有し得る種は幾つか存在するが、前記配列の3位のアミノ酸がグルタミン酸でないように改変されたルシフェラーゼに対応する活性タンパク質は総て本発明により提供されることは明らかである。

本発明の好ましい態様において、本発明のタンパク質は、Luciola属ホタルルシフェラーゼのアミノ酸217またはPhotinus pyralisルシフェラーゼのアミノ酸215に対応する位置のアミノ酸が、ヨーロッ

パ特許出願公開第0524448号に開示されているような疎水性アミノ酸、好ましくはイソロイシン、ロイシンまたはバリンに変更されたアミノ酸を有する。このような変更を行なうと、354位の変更のみの場合よりも熱安定性が向上することが判明した。即ち、これら二つの変更は実質的に互いに独立で、しかも併用可能な効果を有する。

本発明は第二の態様において、本発明のタンパク質をコードするDNAを提供

し、また第三の態様では、本発明のタンパク質を発現し得るような形態を有する、*luc* 遺伝子（ルシフェラーゼをコードする遺伝子）を含むベクター、特にプラスミドを提供する。上記のような形態とはベクターが本発明のタンパク質の発現を制御し得るDNA配列を、微生物宿主細胞への導入時に前記タンパク質が、必要であれば適当な誘導物質の添加により、必要に応じて容易に発現され得るように含む形態のことである。

Photinus pyralis、*Luciola mingrellica*、*Luciola cruciata* 及び *Luciola lateralis* の *luc* 遺伝子はいずれも公知であり、かつ標準的な分子生物学的技術で単離可能である。*Photinus pyralis* の

luc 遺伝子は *Promega* から、プラスミド *pGEM* として市販されている。即ち、本発明のDNAの調製に用いる出発物質を得るのに好ましい方法及び供給源は、(i) 天然のホタルゲノムDNAを用い、このDNAから得た *luc* 遺伝子を、例えばPCRを用いて増幅すること、(ii) *pGEM*、及び (iii) *Kajiyama* 及び *Nakano* の *pGLf37* プラスミドである。ルシフェラーゼ活性、即ちルシフェリンを酸化させて発光を実現する活性を有するタンパク質をコードする更に別の遺伝子も、本発明のDNAを得、かつ遺伝子発現によって究極的に本発明のタンパク質を得るための出発物質の適当な供給源である。

本発明のDNAを調製するべく野生型または他の種類の *luc* 遺伝子进行操作する上で用いるのに適したベクターは、天然グルタミン酸の代替アミノ酸への改変が行なわれる一方で、DNAを内部に含み得る任意のベクターである。例えばヒドロキシルアミンなどの薬剤を用いて化学的に誘発される突然変異の場合、ベクターは特に重要でなく、突然変異誘発過程前後の遺伝子操作を容易にする適当なベクターは当業者であれば多数想起できよう。

luc 遺伝子を前記グルタミン酸において特異的に突然変異させることが好ましく、即ち部位特異的突然変異誘発操作が必要となる。この操作はベクターにお

いて最も容易に実施でき、当業者にも良く知られている。

野生型、及び公知の *luc* 遺伝子、並びに本発明の *luc* 遺伝子の発現に適したベクターには、pKK223-3、pDR540 (Boehringer Mannheim から入手可能) 及び pT7-7 が含まれる。先の2種は、発現がイソプロピルーチオガラクトシド (IPTG) の存在によって誘発されることを可能にするラクトースリプレッサーの制御下に *tac* プロモーターを有する。pT7-7 は T7 RNA ポリメラーゼプロモーターによる制御を可能にし、即ち T7 RNA ポリメラーゼを有する大腸菌細胞におけるきわめて高レベルの遺伝子発現の基礎となる。これらのベクターうちで、pT7-7 ベクターに *luc* 遺伝子を挿入した場合に発現が最高となることが判明した。

pKK223-3 及び pDR540 に挿入された *luc* 遺伝子由来のルシフェラーゼの発現は野生型 N 末端配列ルシフェラーゼの発現をもたらし、一方 pT7-7 に挿入さ

れた *luc* 遺伝子の発現は余分の N 末端アミノ酸 M-A-R-I-Q との融合タンパク質の合成をもたらし。 *luc* 遺伝子を含むベクター (構築物 pPW204、pPW116 及び pPW304 と呼称する) それぞれにおける *luc* 遺伝子のリボソーム結合部位及び開始コドン、実施例の表 1 に示す。

本発明はその第三の態様において、本発明のタンパク質を発現させ得る細胞、該細胞を用いて本発明のタンパク質を製造する方法、並びに本発明のタンパク質を含む試験キット及び試薬を提供する。本発明はまた、ルシフェリン/ルシフェラーゼ試薬を用いて ATP を測定する、当業者に良く知られたアッセイ方法であって、ルシフェラーゼが本発明のタンパク質であることを特徴とする方法も提供する。本発明のルシフェラーゼ調製物は 30～70℃、特に 37～60℃、更には 40～50℃ において、野生型ルシフェラーゼ及び組み換え野生型ルシフェラーゼに比較してより熱安定性である。

本発明のタンパク質の発現には、細胞自身の DNA 中にか、または細胞内に導入されたプラスミドなどのベクター中に存在する DNA 配列を用いて異種タンパク質を発現さ

せ得る任意の細胞を用い得る。このような細胞は典型的には、*Saccharomyces cerevisiae* 細胞などの酵母細胞及び大腸菌細胞などの細菌細胞であるが、タンパク質発現という目的に適った宿主生物は当業者ならほかにも多数想起できよう。タンパク質が昆虫タンパク質であるので、昆虫細胞が好ましいともいえる。タンパク質は、天然ルシフェラーゼ及び公知の組み換えルシフェラーゼに類似の構造を有するタンパク質として発現されてもよく、または前記のようなタンパク質と、他のアミノ酸、ペプチド、タンパク質、または他の化学実体、例えば先に触れた M-A-R-I-Q 配列との融合体または結合体として発現されてもよい。

或る種の宿主は特定の優先コドンを持ち、例えば細菌は場合によっては酵母とは異なるコドンを用いるので、前記のような宿主に導入する DNA は、所与のアミノ酸に関して当該宿主における発現をより好ましく実現する縮重コドンが得られるように改変すれば有利であり得ることは、当業者には明らかであろう。そのような縮重 DNA は当然ながら、本発明の DNA の範囲に含まれる。

大腸菌 BL21 (DE3) は適当な宿主の一つで、誘導

性 lacUV5 プロモーターの制御下にその染色体に安定に組み込まれた T7 RNA ポリメラーゼを有し、即ちこの宿主は pT7-7 由来の構築物と適合性である。BL21 のような大腸菌 B 株は、lon プロテアーゼ及び ompT 外膜プロテアーゼを欠く。これらの欠失は、大腸菌における外来タンパク質の発現及び蓄積を安定化する一助となり得る。先に述べた 3 種の発現構築物をそれぞれ保有する大腸菌 BL21 (DE3) の粗抽出物をアッセイしたところ、最高レベルのルシフェラーゼ発現は構築物 pPW304 を保有する細胞において実現することが判明した (表 2 参照)。

本発明の突然変異タンパク質は熱安定性以外の利点も有する。Photinus 属 354 位/Luciola 属 356 位のアミノ酸を突然変異させると、いずれのアミノ酸または類似体でグルタミン酸を置換するかに依存してルシフェリンの酸化の際に発せられる光の波長が変化することが判明した。即ち、本発明は、特異的結合物質のラベルとして用いるルシフェラーゼ、またはそのタンパク質産

物が用いられるルシフェリン酸化の際に特定波長の光として自身の存在 (i d e n t i t y) を報告し返すリポーター遺伝子

伝子も提供する。上記のような特性の獲得では、グリシン、プロリン及びアスパラギン酸などを用いる突然変異も利用できる。本発明のタンパク質はまた、その熱安定性が向上することから、後段に例示するように比較的高温、例えば37℃以上の温度の下でも対応して向上した収率で製造可能であるという利点も有する。

本発明のタンパク質、DNA、ベクター及び細胞の一例を、次の非限定的実施例、添付図面、諸表及び配列表を参照しつつ以下に詳述する。別のタンパク質、タンパク質結合体、DNA、ベクター及び細胞、並びにこれらのうちのいずれかを包含するアッセイ及び試験キットも、ここに説明するものに照らせば当業者には想起されよう。

図面の簡単な説明

図1は後述の実施例に記載する l u c 遺伝子の挿入によって p K K 2 2 3 - 3 から得たプラスミド p P W 2 0 4 の制限酵素地図である。

図2は後述の実施例に記載する l u c 遺伝子の挿入によって p D R 5 4 0 から得たプラスミド p P W 1 1 6 の制限酵素地図である。

図3は後述の実施例に記載する l u c 遺伝子の挿入に

よって p T 7 - 7 から得たプラスミド p P W 3 0 4 の制限酵素地図である。

図4は p D R 5 4 0 と、X h o 部位を除去した p G E M - l u c 由来の B a m H 1 / S s t 1 断片とから得たプラスミド p P W 6 0 1 a の制限酵素地図である。

図5は実施例に後述するように所与の温度で20分間インキュベートした組み換え及び野生型 P h o t i n u s 属ルシフェラーゼ (S i g m a) の熱失活のグラフである。

図6は異なる温度下で増殖させた大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p P W 3 0 4 の粗抽出物中のルシフェラーゼ活性のグラフである。

図7はpPW304及びpPW304M-1（グルタミン酸354がリシンで置換されるようにコードする本発明のプラスミド）に由来するルシフェラーゼ活性の熱失活のグラフである。

図8はSigma野生型、pPW304及びpPW304M-1組み換えルシフェラーゼの37℃での経時失活のグラフである。

図9はTaborから得たpT7-7の制限酵素地図である。

図10は野生型の354位のグルタミン酸がアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グルタミン、ヒスチジン、アスパラギン、メチオニン、アルギニン、リシン、セリン、トレオニン及びシステインでそれぞれ置換されたルシフェラーゼを発現する本発明のルシフェラーゼ発現大腸菌の粗細胞抽出物活性の、40℃のPromega溶解緩衝液中での熱失活を示すグラフである。

図11はE354Kリシン変更及びA215Lロイシン変更を有する精製二重突然変異ルシフェラーゼ活性のリン酸緩衝液中47℃での熱失活を、単一突然変異体A215L及びE354Kと比較して示すグラフである。

図12は0.02%アジドを加えたpH7.75のHEPES緩衝液中37℃におけるリシンE354K突然変異ルシフェラーゼ、組み換え野生型ルシフェラーゼ及び天然ホタルルシフェラーゼの初期活性残存率(%)の経時変化を示すグラフである。

図13は組み換え野生型、E354K単一突然変異体及びE354K+A215L二重突然変異体の37℃でのルシフェラーゼ発現を、培養細胞密度の尺度としての光学密

度の上昇をルシフェラーゼ活性に対してプロットすることによって示すグラフである。

図14は1%BSA及び0.02%アジドを含有するpH7.75のHEPES中37℃における、各10ng/mlのA215L単一突然変異、E354K単一突然変異、A215L+E354K二重突然変異、組み換え及びSigma

野生型ルシフェラーゼの初期活性残存率(%)の5時間にわたる経時変化を示すグラフである。

図15は1%BSA、0.02%アジド、2mMEDTA及び2mMDTTを含有するpH7.75のHEPES中37℃における、各10ng/mlのA215L単一突然変異、E354K単一突然変異、A215L+E354K二重突然変異、組み換え及びSigma野生型ルシフェラーゼの初期活性残存率(%)の5時間にわたる経時変化を示すグラフである。

配列表:

本明細書本文の最後に添付した配列表に、次のDNA及びアミノ酸配列を示す。

配列番号1には、*Photinus pyralis*野生型の1063～1065位に位置するコドンに突然変異

させた、本発明のルシフェラーゼをコードするDNAのDNA配列を示す。リシンを得るには1063位の塩基をAに突然変異させる。

配列番号2には、*Photinus pyralis*野生型のアミノ酸354のグルタミン酸を別のアミノ酸に変更した本発明のタンパク質のアミノ酸配列を示す。

配列番号3には、実施例2においてpPW601をSDM突然変異させ、それによって354位にグルタミン酸に替えてリシンを得るのに用いたオリゴヌクレオチドの配列を示す。

配列番号4には、実施例5においてpPW601をSDM突然変異させ、それによって215位にロイシンを得るのに用いたオリゴヌクレオチドの配列を示す。

配列番号5には、*Photinus pyralis*野生型のアミノ酸354のグルタミン酸を他の任意のアミノ酸に変更し、かつアミノ酸215をロイシンに変更した本発明のタンパク質のアミノ酸配列を示す。

実施例

実施例1: 本発明のDNAを含むプラスミドの作製

Boehringer Mannheimからプラスミ

ドpKK223-3及びpDR540を得た。pDR540はPharmaciaからも入手可能である。

マサチューセッツ州、ボストン所在のHarvard Medical School、生物化学部のStan Taborから、プラスミドpT7-7 (Molecular Biology 第II巻, 16, 2, 1, 章のCurrent protocols 参照)を得たが、該プラスミドは、(図8に示されているように)pT7-5のPvuIIとClaI部位の間に挿入されたT7遺伝子10タンパク質(T7 22857~22972bp)のT7 RNAポリメラーゼプロモーターφ10及び翻訳開始部位を含んでいる。(5'末端に充填後)融合タンパク質を作製するための単一制限部位は、フレーム0: EcoRI; フレーム1: NdeI、SmaI、ClaI; フレーム2: BamHI、SalI, HindIIIである。元のポリリンカーのSacI部位を欠失により除去し、追加のXbaI部位を開始コドンの上流に設ける。

Sigma Chemical Co. からホタルルシフェラーゼ(カタログ番号L9009の結晶懸濁液から調製)、補酵素A及びATPを得た。甲虫ルシフェリンカ

リウム塩はPromegaから得た。細胞抽出物をPromegaテクニカルブレットイン 101号に記載のように調製した。E. coli培養物の一部を細胞溶解試薬(25mM トリスーリン酸、pH7.8、2mM DTT、2mM EDTA、10%グリセロール、1% トリトン X-100、2.5mg/ml BSA、1.25mg/ml リゾチーム)中で室温で10分間溶解し、次いでアッセイに先立ち、氷上に保存した。

コロニーをナイロンフィルター(Hybond N, Amersham)に移し、次いで該フィルターを、0.5mM ルシフェリンを含有する100mMクエン酸ナトリウム緩衝液pH5.0 [Wood & DeLuca, (1987) Anal Biochem 161 501-507ページ]に浸して、該コロニ

ーが発光する生物発光をモニターして、細胞系のルシフェラーゼ活性をアッセイした。125 μ lのアッセイ緩衝液(20 mM トリシン、1 mM $MgSO_4$ 、0.1 mM EDTA、33.3 mM DTT、0.27 mM 補酵素A、0.47 mM ルシフェリン、0.53 mM ATP及び1~2 μ lの試料)を用い、25℃で、*in vitro*ルシフェラーゼアッセイを実

施した。アッセイカクテルの最終pHは7.8であり、BioOrbit 1250ルミノメーターを用いて光測定を行った。

DNAの非特異的化学突然変異体を作製するために、Kirondeら(1989) *Biochem. J.* 259, 421-426ページの方法に従って、0.1 mMリン酸ナトリウムpH6.0中0.8 M ヒドロキシルアミン、1 mM EDTAを用い、65℃で2時間、*luc*遺伝子を含むプラスミドを処理した。突然変異を起こしたプラスミドをG60 DNAグレードNickカラム(*Pharmacia*)上で脱塩し、次いで、*E. coli* BL21(DE3)に形質転換した。

ルシフェラーゼ活性を有する粗細胞抽出物を種々の温度で20分間インキュベートし、残留活性を測定して、熱失活実験を実施した。*Sigma*から得た精製ルシフェラーゼを用いた実験では、失活に先立ち、酵素を*Promega*溶解緩衝液に希釈した。経時変化実験では、溶解緩衝液中50 μ lの粗細胞抽出物又は*Sigma*ルシフェラーゼを含むエッペンドルフ管を37℃でインキュベートした。アッセイに先立ち、種々の時間に管を取り出し、氷上で冷

却した。残留(又は残存)活性は初期の活性の百分率として表した。

各構築物、pPW204、pPW116及びpPW304からのルシフェラーゼの相対的発現レベルは、*E. coli* BL21(DE3)では0.1:0.5:1.0である。LB中37℃でOD₆₀₀が0.3になるまで細胞を増殖させ、次いで、IPTGにより誘発、4時間増殖を継続させた後、粗抽出物を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

表 1 : 実施例 1 に用いた発現構築物のリボソーム結合部位

(下線) 及び開始コドン

pPW304 AAGGAGATATACAT ATG* CGT AGA ATT CAA ATG
 pPW116 AGGAAACAGGATCCA ATG*
 pPW204 AGGAAACAGCAA ATG*

以下のプロトコルを用い、グルタミン酸を別のアミノ酸に変換するに必要な部位特異的突然変異誘発を実施した。グルタミン酸からリシンへの突然変異は単一 A v a I 制限部位内に存在し、従って該部位を破壊するので、単一のオリゴヌクレオチドを突然変異誘発及び選択オリゴヌクレオ

チドとして用いることが可能である。

部位特異的突然変異誘発プロトコル：

選択したプラスミドをリシン用の選択／突然変異誘発オリゴヌクレオチド：5'-CATCCCCCTTGGGTGTAATCAG-3'〔下線を付したTは不適正（ミスマッチ）塩基である〕で変性・アニーリングする。突然変異DNA鎖を合成、連結し、一次制限部位全体をA v a Iで消化する。

B i o - R a d G e n e P u l s e r 2 - 8 9 型を用い、細胞、この場合はE . c o l i B M H 7 1 - 1 8 突然変異S細胞への形質転換を実施した。収穫した細胞と、突然変異を起こしたプラスミド及び親プラスミドを含む精製混合プラスミドプールとを得、A v a Iによる二次制限消化を実施して、E . c o l i J M 1 0 9 細胞に形質転換した。これらの細胞を選択培地（LB寒天+50 μ g/ml アンピシリン）上に置き、クローンのプニラスミドDNAを精製し、A v a I 制限部位の欠損を分析してクローンのスクリーニングを行った。いずれの場合にも、B i r n b o i m 及びD o l y (1 9 7 9) N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 7 , 1 5 1 3 ページのアルカリ溶解法を用いてプラスミドDNAを精製した。厳密なプ

ロトコルは、C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s I n c (U S) から

カタログ番号K1600-1として販売されている、Transformer^{RT}部位特異的突然変異誘発キット（バージョン2）に記載の通りであった。

Pharmacia pDR540と、Xho部位が破壊されたpGEM-lucからのBamHI/SstIフラグメントとから誘導されたpPW116の変異体であるpPW601aの制限地図を図4に示す。上記のように、Clontechの指示に従って、挿入された野生型Photinusのluc遺伝子を、発現されたタンパク質のアミノ酸配列が配列番号2に示されているように354位でリシンに改変されている配列番号1（1063-1065はAAGである）に示されている配列に変換するように部位特異的突然変異誘発を実施した。

実施例2：ルシフェラーゼの熱安定性

E. coliにおいて上記のように作製されたベクター中の非改変及び改変（即ち、本発明の）luc遺伝子によって発現された種々のルシフェラーゼの熱安定性を測定し、結果を図5～図8に示す。

50mM リン酸カリウム緩衝液pH7.8、1mM EDTA、0.2%（w/v）BSA、1mM DTT及び10% 硫酸アンモニウム中、43.5℃で50μg/mlのルシフェラーゼ活性の $t_{1/2}$ （半減期）の比較は、以下のような時間で到達する残留50%活性を示す。

$t_{1/2}$

Sigma野生型ルシフェラーゼ：約1.5分で到達
pPW601（354＝グルタミン酸）：約5分で到達
pPW601aK（354＝リシン）：約30分で到達

上記数値から明らかなように、354グルタミン酸をリシンで置換すると、ルシフェラーゼの熱安定性が少なくとも43.5%まで増大することがわかる。

実施例3：ルシフェラーゼの熱安定性

E. coliにおいて実施例1に記載のものと類似の方法で作製したベクター中の本発明の他の354位突然変異に対応するSDM改変luc遺伝子により発現された多くのルシフェラーゼの熱安定性を測定し、結果を図10にグラフで示す。

P r o m e g a 溶解緩衝液中40℃で $t^{1/2}$ の比較を行い、以下のような $t^{1/2}$
(分)の結果を得た：

	$t^{1/2}$
pPW601aK (354=リシン)：	約13分で到達
pPW601aR (354=アルギニン)：	約13分で到達
pPW601aL (354=ロイシン)：	約10分で到達
pPW601aI (354=イソロイシン)：	約10分で到達
pPW601aN (354=アスパラギン)：	約10分で到達
pPW601aV (354=バリン)：	約9分で到達
pPW601aW (354=トリプトファン)：	約8分で到達
pPW601aA (354=アラニン)：	約6.5分で到達
pPW601aY (354=チロシン)：	約6.5分で到達
pPW601aM (354=メチオニン)：	約5.5分で到達
pPW601aF (354=フェニルアラニン)：	約5分で到達
pPW601aH (354=ヒスチジン)：	約5分で到達
pPW601aT (354=トレオニン)：	約4.5分で到達
pPW601aQ (354=グルタミン)：	約4.5分で到達
pPW601aC (354=システイン)：	約4分で到達
pPW601aS (354=セリン)：	約3.5分で到達
pPW601aE (354=グルタミン酸)：	約1分で到達
pPW601aD (354=アスパラギン酸)：	約1分で到達
pPW601aP (354=プロリン)：	約1分で到達
pPW601aG (354=グリシン)：	約<1分で到達

実施例4：37℃及び室温でのルシフェラーゼの安定性

pPW601Kリシン突然変異ルシフェラーゼ(86ng/ml)、組換え野生型ルシフェラーゼ(550ng/ml)及び天然型ルシフェラーゼ(Sigma)(62.

5ng/ml)を、1%BSA、保存剤として0.02%アジドを含むpH7

、75 HEPES 緩衝液中 37℃で4時間インキュベートした。残留活性を測定するために、D-ルシフェリン基質に1 ngのルシフェラーゼを加え、1分当たりの発光カウント数を記録した。

37℃で2時間、室温で10日間インキュベートした後の残留活性に関する結果を以下に示す。

37℃で2時間後：

E 3 5 4 K 突然変異ルシフェラーゼ	残留活性 70 %
組換え野生型ルシフェラーゼ	残留活性 12 %
S i g m a 天然ルシフェラーゼ	残留活性 18 %

室温で10日後：

E 3 5 4 K 突然変異ルシフェラーゼ	残留活性 85 %
組換え野生型ルシフェラーゼ	残留活性 59 %
S i g m a 天然ルシフェラーゼ	残留活性 71 %

実施例 5：354K：215L 二重突然変異体の作製及び安定性

実施例 1 に記載のように、p P W 6 0 1 a E 3 5 4 K を得、これを、配列番号 4 のオリゴヌクレオチド、5'-GAATCTGACGCAGAGAGTTCTATGCGG-3'〔下線を付した塩基は突然変異を引き起こす不適正（ミスマッチ）塩基を表す〕

を用いて突然変異を起こさせ、p P W 6 0 1 a P h o t i n u s p y r a l i s ルシフェラーゼの 354 リシン：215 ロイシン二重突然変異体を作製した。熱失活媒体として 1 mM E D T A、0.2 % (w/v) B S A、1 mM D T T 及び 10 % 硫酸アンモニウムを含む pH 7.8 リン酸緩衝液を用い、実施例 2 から 4 に記載のようにして、実施例 1 に記載のものと類似の方法により E. c o l i 中で発現させて得られたルシフェラーゼの DNA 配列決定及び熱安定性の測定によりこの突然変異体を確認した。

リン酸緩衝液中 43.5℃では、32 分間にわたる活性の損失は 5 % 未満であったのに対し、47℃では、 $t_{1/2}$ は約 38 分であった。50℃では、二重突然変異体は、16 分間のインキュベーション後に 15 % の活性を保持している。この失活テストの結果を図 12 にグラフで示す。

実施例6：ルシフェラーゼの精製

組換え野生型又は突然変異ルシフェラーゼを発現する *E. coli* JM109細胞を、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む *Luria Broth* (LB) 中 30°C で増殖させ、初期対数増殖期の間に IPTG (1mM) により誘発させた。中間の静止期に細胞を収穫し、 50mM K

Cl、 1mM ジチオトレイトール、 $1, 2\text{mM}$ フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 及び 1mM EDTA を含む 50mM トリス-HCl pH 8.0 (緩衝液A) に再懸濁した。MSE soniprep 150音波処理装置 (振幅： 14μ) 中で細胞を破壊し、細胞溶解物を $30,000\times g$ で30分間遠心した。次いで、粗抽出物の上清を硫酸アンモニウムで分画し、35～55%飽和の間に沈殿した画分が、ルシフェラーゼ活性を含むことが見いだされ、緩衝液Aに溶解した。

0.5mM DTTを含む 50mM トリス-HCl pH 8.0 (緩衝液B) 中で平衡にした Pharmacia PD10カラムを用いて抽出物を脱塩し、脱塩抽出物を Pharmacia Mono Qアニオン交換カラムにかけ、緩衝液B中 $0\rightarrow 500\text{mM}$ の直線勾配の NaCl を用い流速 $4\text{ml}/\text{分}$ で 2ml の画分として溶離した。ルシフェラーゼ活性のピーク画分を捕集し、長期保存するために、 0.5mM DTT 及び 12% (v/v) グリセロールを含む 25mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 7.5 に溶解した。

実施例7：精製ルシフェラーゼの熱失活

実施例6に記載のように、ルシフェラーゼの無細胞抽出物を含むエッペンドルフ管を準備した。精製したルシフェラーゼ調製物 ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) を、 10% 飽和硫酸アンモニウム、 1mM ジチオトレイトール及び 0.2% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む 50mM リン酸カリウム緩衝液 pH 7.8 からなる熱安定性緩衝液中でインキュベートした。アッセイに先立ち、設定時間に管を取り出して氷/水浴中で冷却し、定量残留活性を初期活性の百分率として計算した。

$42\sim 50^\circ\text{C}$ の温度範囲にわたって熱安定性緩衝液中での失活の半減期を測定

して、精製された組換え野生型及び熱安定性ルシフェラーゼのアウレニウスプロットを作成した。次いで、 $t^{1/2}$ (分) の自然対数値を $1/K$ に対してプロットした。等しい失活率に対して、E354K 突然変異体はこの範囲の温度で熱安定性を 2°C 上昇させるのに対し、A215L 突然変異体は 5°C 上昇させ、二重突然変異体 E354K + A215L は 6°C 上昇させる。後者は、二重突然変異体の付加的性質を示している。

実施例 8 : E. coli において野生型組換えルシフェラーゼに比べて増大した突然変異ルシフェラーゼの発現

E. coli JM109 細胞におけるルシフェラーゼの発現を液状培地中 37°C での増殖中にモニターした。増殖中に、熱安定性突然変異体を発現する細胞は、組換え野生型酵素を発現する細胞に比べてより高い活性のルシフェラーゼを蓄積することが判明した。図 13 は、組換え野生型、E354K + A215L 二重突然変異体及び E354K の培養物について、 600 nm で増大する光学密度に対してルシフェラーゼ活性をプロットした際の上記作用をグラフで示している。単一及び二重突然変異体の熱安定性が増大すると、培養温度 37°C でのルシフェラーゼの産生が増大し得ることがわかる。

実施例 9 : 37°C での突然変異ルシフェラーゼの安定性に対する緩衝液の作用

1% BSA 及び 0.02% アジドを含む HEPES pH 7.75 緩衝液中、A215L、E354K、E354K + A215L、組換え野生型及び Sigma ルシフェラーゼそれぞれの 10 ng/ml 溶液を調製し、 37°C での熱安定性を、2 mM EDTA 及び 2 mM DTT を添加した同一組成物と比較した。結果を図 14 及び図 15 に示す。該結果は、A215L 及び E354K の 37°C での相

対安定性が緩衝液によって変化することを示している。

実施例 10 : D-ルシフェリンの酸化により発光した光の波長に対するアミノ酸置換の影響

D-ルシフェリンを実施例 3 に記載の種々の本発明ルシフェラーゼで酸化した

ときに発光した光の波長を測定し、該波長がアミノ酸の突然変異によって変化することを知見した。発光した光の波長は、組換え野生型（E354）とE354Kとでは5nmの変化があり、E354KとE354Iとでは約15nmの変化があった。

野生型組換えE. coli 微生物はD-ルシフェリンの存在下に黄緑色の発光を示す。D-ルシフェリンを加えた場合の各突然変異E. coli による発光色は以下の通りであった：

E354G	黄緑色
E354N	黄緑色
E354A	緑色
E354V	橙赤色
E354M	橙赤色
E354F	黄緑色
E354L	黄色
E354Y	黄緑色
E354S	黄緑色
E354C	黄緑色
E354K	黄色
E354Q	黄緑色
E354W	黄緑色
E354T	黄緑色
E354P	橙色
E354R	黄橙色
E354H	黄緑色
E354N	黄色
E354I	赤色。

〔配列表〕

配列番号：1

配列の長さ：1722

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：G e n o m i c D N A

ハイボセティカル：N O

アンチセンス：N O

起源

生物名：P h o t i n u s p y r a l i s

配列の特徴

特徴を表す記号：C D S

存在位置：4..1653

配列

CAAATGGAAG ACGCCAAAAA CATAAGAAA GGCCCGGCGC CATTCTATCC TCTAGAGGAT	60
GGAACCGCTG GAGAGCAACT GCATAAGGCT ATGAAGAGAT ACGCCCTGGT TCCTGGAACA	120
ATTGCTTTTA CAGATGCACA TATCGAGGTG AACATCACGT ACGCGGAATA CTTCGAAATG	180
TCCGTTCGGT TGGCAGAAGC TATGAAACGA TATGGGCTGA ATACAAATCA CAGAATCGTC	240
GTATGCAGTG AAAACTCTCT TCAATTCTTT ATGCCGGTGT TGGGCGCGTT ATTTATCGGA	300
GTTGCAGTTG CGCCCGCGAA CGACATTTAT AATGAACCTG AATTGCTCAA CAGTATGAAC	360

ATTTCCGAGC CTACCGTAGT GTTTGTTC	AAAAAGGGT TGCAAAAAAT TTTGAACGTG	420
CAAAAAAAT TACCAATAAT CCAGAAAATT	ATTATCATGG ATTCTAAAAC GGATTACCAG	480
CGATTTCAGT CGATGTACAC GTTCGTCACA	TCTCATCTAC CTCCCGGTTT TAATGAATAC	540
GATTTTGTAC CAGAGTCCTT TGATCGTGAC	AAAACAATTG CACTGATAAT GAATTCCTCT	600
GGATCTACTG GGTACCTAA GGGTGTGGCC	CTTCGCGATA GAACTGCCTG CGTCAGATTC	660
TCGCATGCCA GAGATCCTAT TTTTGGCAAT	CAAATCATTG CGGATACTGC GATTTTAAGT	720
GTTGTTCAT TCCATCACGG TTTTGGAAATG	TTTACTACAC TCGGATATTT GATATGTGGA	780
TTTCGAGTCG TCTTAATGTA TAGATTTGAA	GAAGAGCTGT TTTTACGATC CCTTCAGGAT	840
TACAAAATTC AAAGTGCCTT GCTAGTACCA	ACCCTATTTT CATTCTTCGC CAAAAGCACT	900
CTGATTGACA AATACGATTT ATCTAATTTA	CACGAAATTG CTTCTGGGGG CGCACCTCTT	960
TCGAAAGAAG TCGGGGAAGC GGTTCGAAAA	CGCTTCCATC TTCCAGGGAT ACGACAAGGA	1020
TATGGGCTCA CTGAGACTAC ATCAGCTATT	CTGATTACAC CCNNNGGGGA TGATAAACCG	1080
GGCGCGGTCC GTAAAGTTGT TCCATTTTTT	GAAGCGAAGG TTGTGGATCT GGATACCGGG	1140
AAAACGCTGG GCGTTAATCA GAGAGGCGAA	TTATGTGTCA GAGGACCTAT GATTATGTCC	1200
GGTTATGTAA ACAATCCGGA AGCGACCAAC	GCCTTGATTG ACAAGGATGG ATGGCTACAT	1260
TCTGGAGACA TAGCTTACTG GGACGAAGAC	GAACACTTCT TCATAGTTGA CCGCTTGAAG	1320
TCTTTAATTA AATACAAAGG ATATCAGGTG	GCCCCGCTG AATTGGAATC GATATTGTTA	1380
CAACACCCCA ACATCTTCGA CGCGGGCGTG	GCAGGTCTTC CCGACGATGA CGCCGGTGAA	1440
CTTCCCGCCG CCGTTGTTGT TTTGGAGCAC	GGAAAGACGA TGACGGAAAA AGAGATCGTG	1500
GATTACGTCC CCAGTCAAGT AACAACCGCG	AAAAAGTTGC GCGGAGGAGT TGTGTTTGTG	1560
GACGAAGTAC CGAAAGGTCT TACCGGAAAA	CTCGACGCAA GAAAAATCAG AGAGATCCTC	1620
ATAAAGGCCA AGAAGGGCGG AAAGTCCAAA	TTGTAAAATG TAACTGTATT CAGCGATGAC	1680
GAAATTCTTA GCTATTGTAA TCCTCCGAGG	CCTCGAGGTC GA	1722

配列番号：2

配列の長さ：550

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

ハイボセティカル：NO

起源

生物名：Photinus pyralis

配列の特徴

特徴を表す記号：改変部位

存在位置：354

配列

```

Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr Pro
1          5          10          15
Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys Arg
          20          25          30
Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile Glu
          35          40          45
Val Asn Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu Ala
          50          55          60
Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val Val
          65          70          75          80
Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala Leu
          85          90          95

```

Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu Arg
 100 105 110
 Glu Leu Leu Asn Ser Met Asn Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe Val
 115 120 125
 Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu Pro
 130 135 140
 Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln Gly
 145 150 155 160
 Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
 165 170 175
 Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile
 180 185 190
 Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 195 200 205
 Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
 210 215 220
 Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
 245 250 255
 Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
 325 330 335
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Xaa Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365

Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 420 425 430
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460
 Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu Leu 465
 470 475 480
 Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu Lys
 485 490 495
 Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys Leu
 500 505 510
 Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
 515 520 525
 Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys Lys
 530 535 540
 Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 545 550

配列番号 : 3

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 不明

配列の種類 : G e n o m i c D N A

ハイボセティカル : N O

起源

生物名 : P h o t i n u s p y r a l i s

配列の特徴

特徴を表す記号 : m i c s - . d i f f e r e n c e

存在位置 : 置換 (1 0 , " ")

配列

CATCCCCCTT GGGTGTAAATC AG

22

配列番号 : 4

配列の長さ : 27

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 不明

配列の種類：G e n o m i c D N A

ハイボセティカル：N O

起源

生物名：P h o t i n u s p y r a l i s

配列の特徴

特徴を表す記号：m i c s _ _ d i f f e r e n c e

存在位置：置換（16..17，“”）

配列

GAATCTGACG CAGAGAGTTC TATGCGG

27

配列番号：5

配列の長さ：5 5 0

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：タンパク質

ハイボセティカル：N O

起源

生物名：P h o t i n u s p y r a l i s

配列の特徴

特徴を表す記号：改変部位

存在位置：3 5 4

配列の特徴

特徴を表す記号：改変部位

存在位置：2 1 5

配列

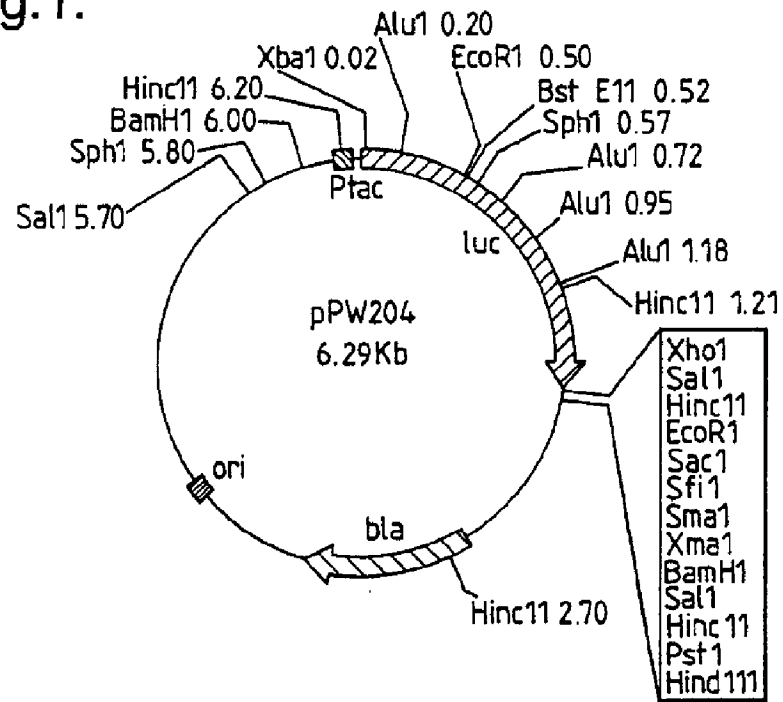
Met	Glu	Asp	Ala	Lys	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Pro	Ala	Pro	Phe	Tyr	Pro	1	5	10	15
Leu	Glu	Asp	Gly	Thr	Ala	Gly	Glu	Gln	Leu	His	Lys	Ala	Met	Lys	Arg	20	25	30	
Tyr	Ala	Leu	Val	Pro	Gly	Thr	Ile	Ala	Phe	Thr	Asp	Ala	His	Ile	Glu	35	40	45	
Val	Asn	Ile	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Phe	Glu	Met	Ser	Val	Arg	Leu	Ala	50	55	60	
Glu	Ala	Met	Lys	Arg	Tyr	Gly	Leu	Asn	Thr	Asn	His	Arg	Ile	Val	Val	65	70	75	80
Cys	Ser	Glu	Asn	Ser	Leu	Gln	Phe	Phe	Met	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Leu	85	90	95	
Phe	Ile	Gly	Val	Ala	Val	Ala	Pro	Ala	Asn	Asp	Ile	Tyr	Asn	Glu	Arg	100	105	110	
Glu	Leu	Leu	Asn	Ser	Met	Asn	Ile	Ser	Gln	Pro	Thr	Val	Val	Phe	Val	115	120	125	
Ser	Lys	Lys	Gly	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Lys	Leu	Pro	130	135	140	
Ile	Ile	Gln	Lys	Ile	Ile	Ile	Met	Asp	Ser	Lys	Thr	Asp	Tyr	Gln	Gly	145	150	155	160

Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly Phe
 165 170 175
 Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr Ile
 180 185 190
 Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 195 200 205
 Ala Leu Pro His Arg Thr Leu Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg Asp
 210 215 220
 Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu
 245 250 255
 Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu Leu
 260 265 270
 Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu Val
 275 280 285
 Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys Tyr
 290 295 300
 Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile
 325 330 335
 Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr
 340 345 350
 Pro Xaa Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe
 355 360 365
 Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val
 370 375 380
 Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly
 385 390 395 400
 Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly
 405 410 415
 Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe
 420 425 430
 Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln
 435 440 445
 Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn Ile
 450 455 460

[illegible]

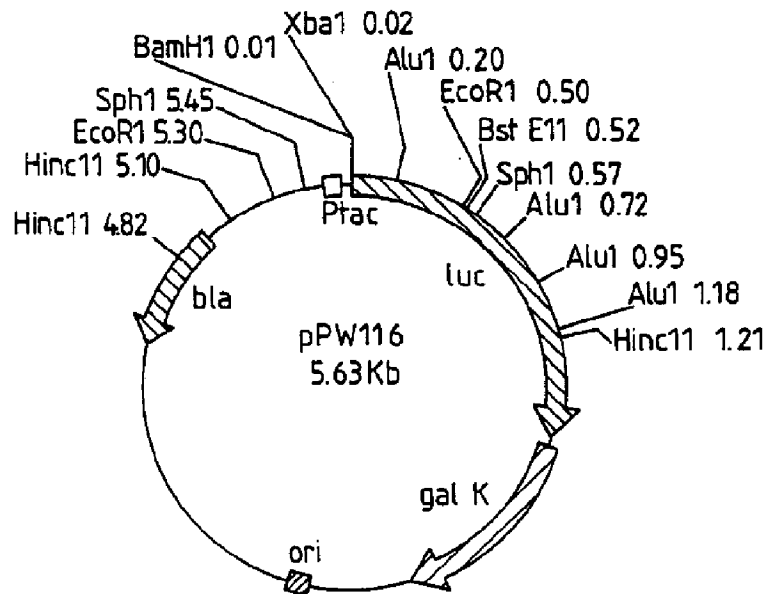
【図1】

Fig.1.



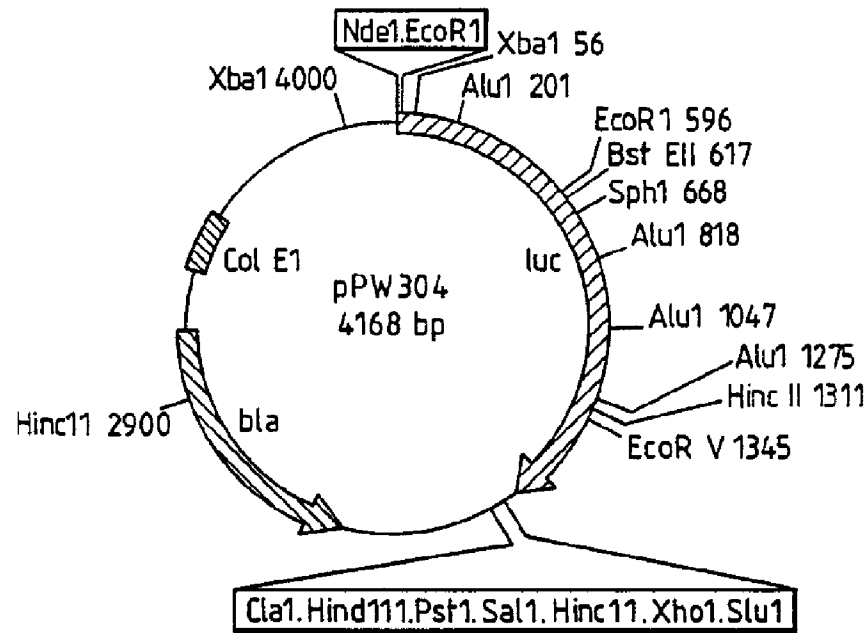
【図2】

Fig.2.



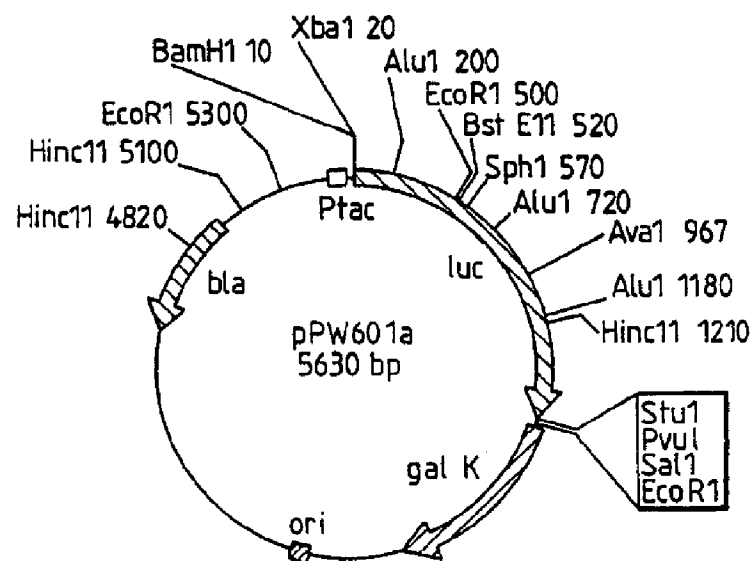
【 図 3 】

Fig.3.

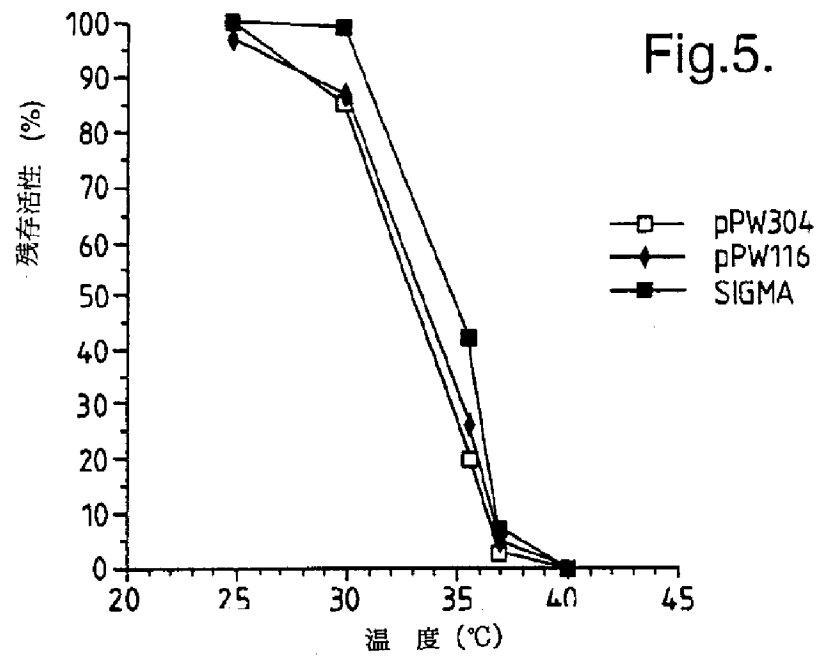


【 図 4 】

Fig.4.



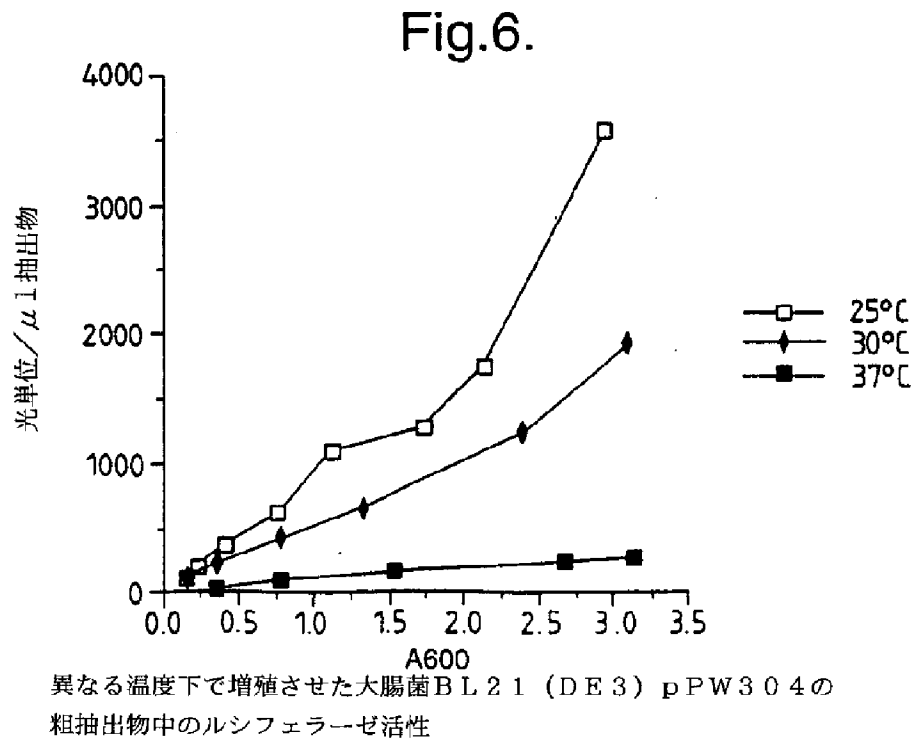
【図5】



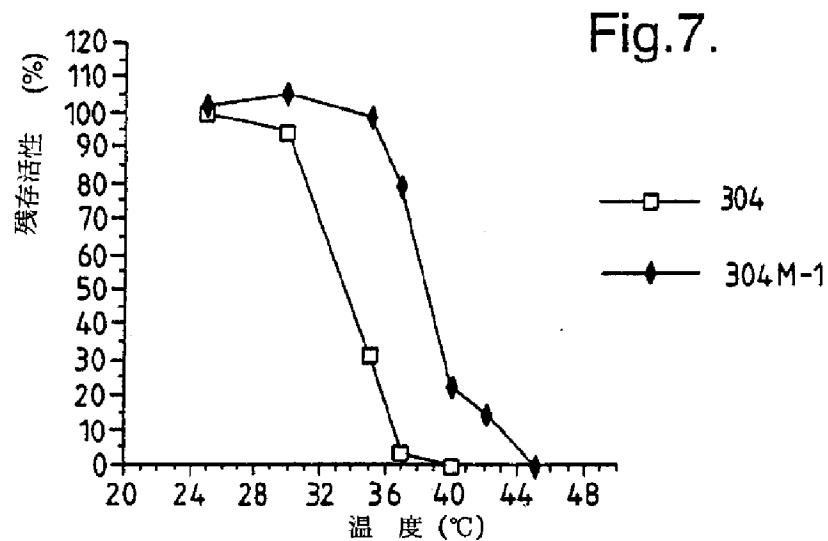
組換え及び野生型 (sigma) ルシフェラーゼの熱失活

「方法」に述べたように酵素を20分間インキュベートした

【図6】

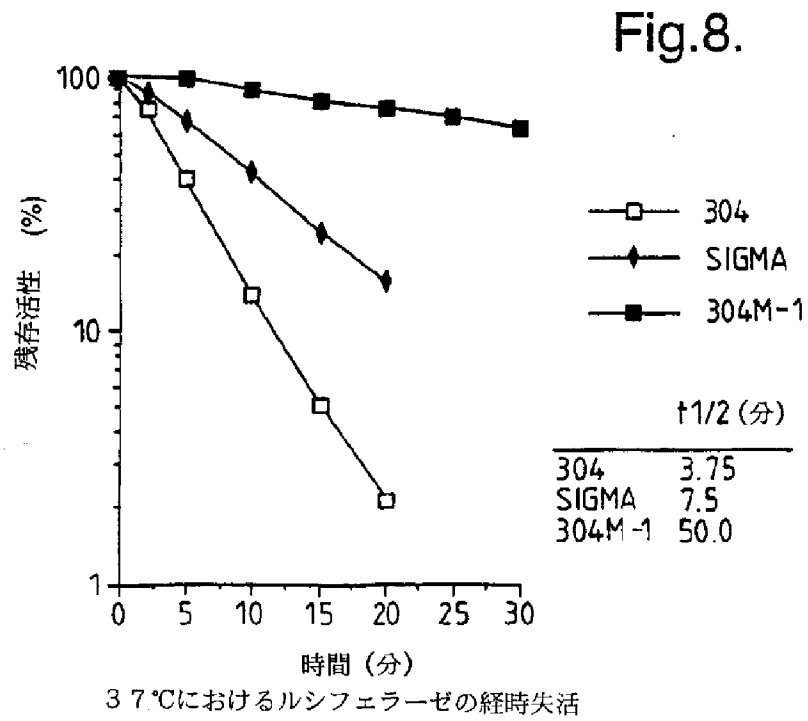


【図7】



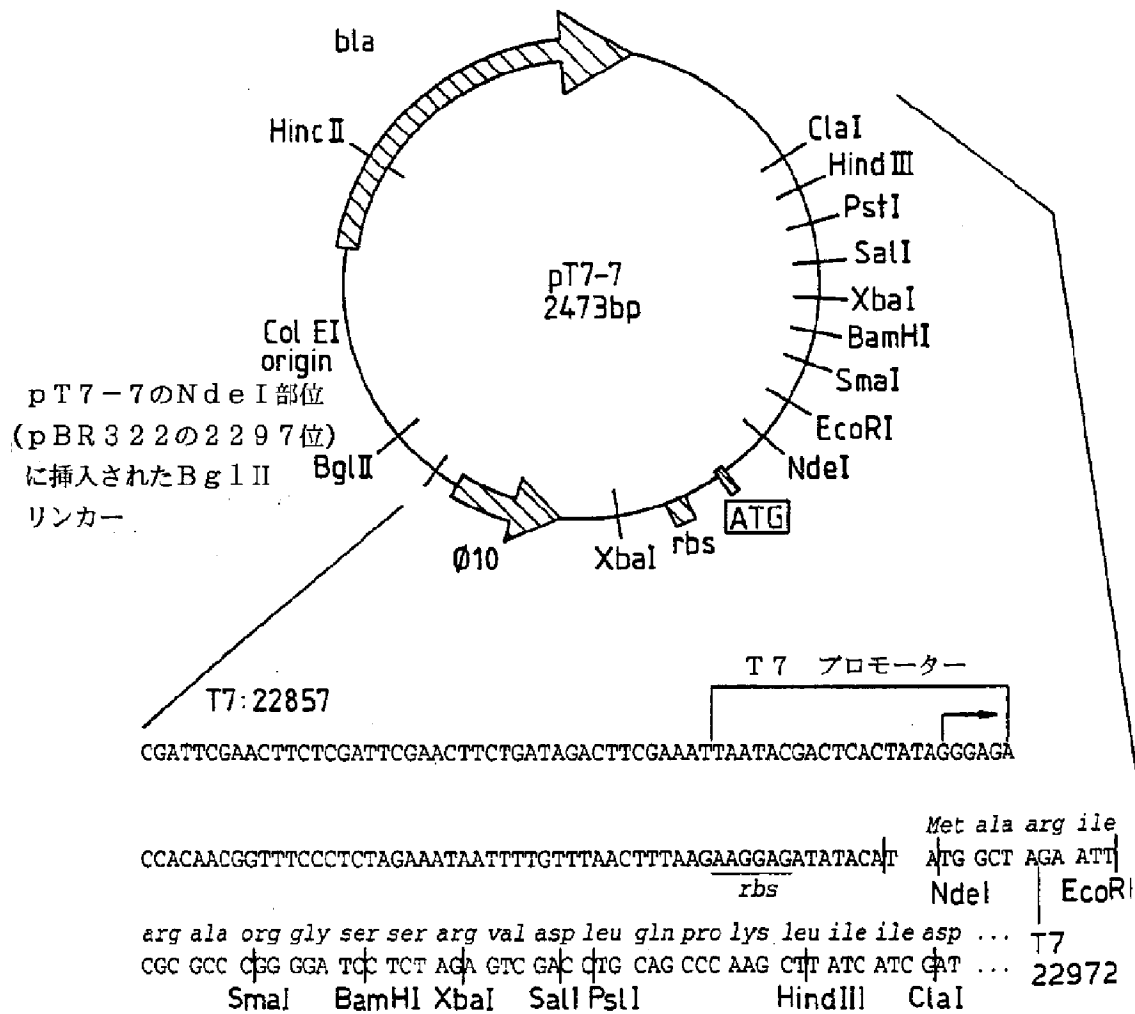
ルシフェラーゼ304及び304M-1の熱失活
「方法」に述べたように酵素を20分間インキュベートした

【図8】



【図9】

Fig.9.



【図10】

Promega溶解緩衝液(40℃)中のE354X突然変異体の失活

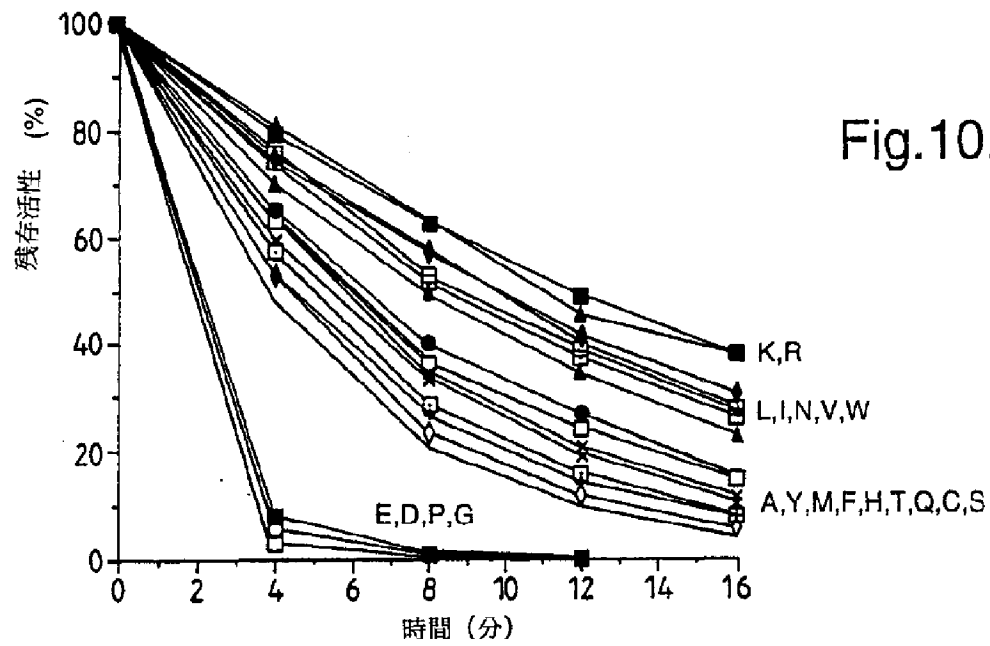
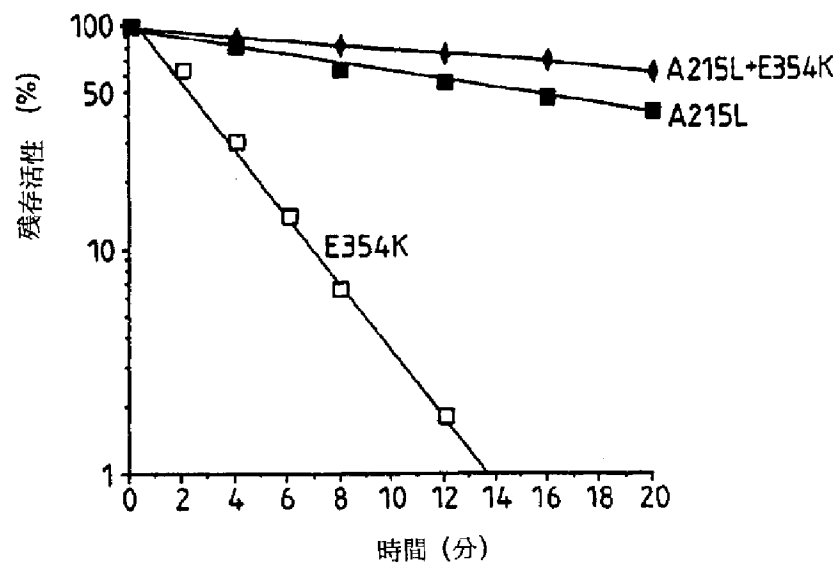


Fig.10.

【図11】

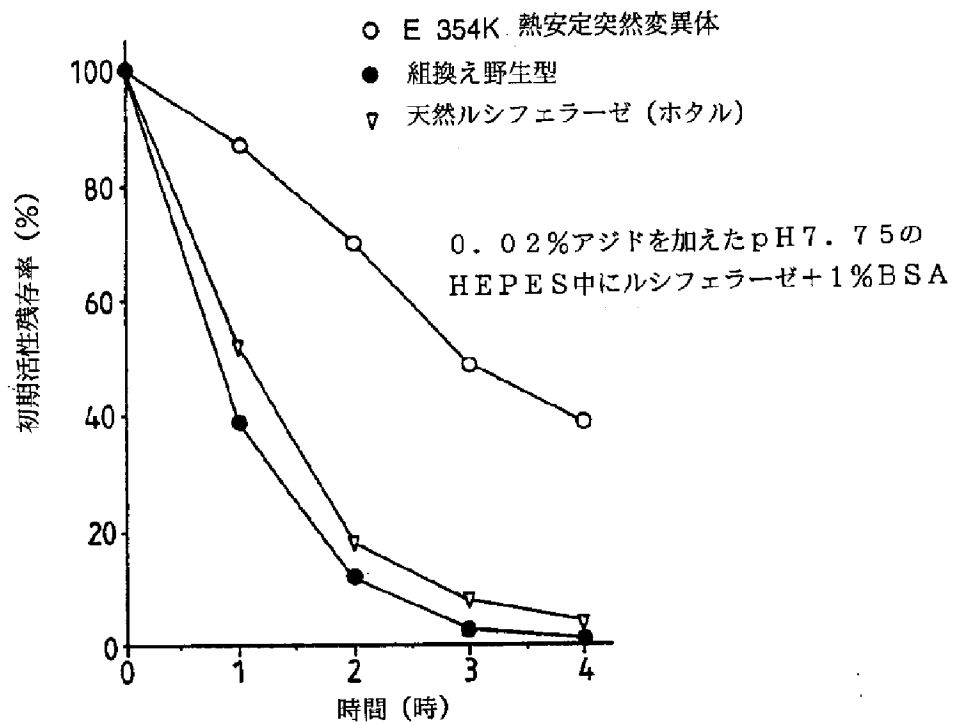
47℃での熱失活

Fig.11.



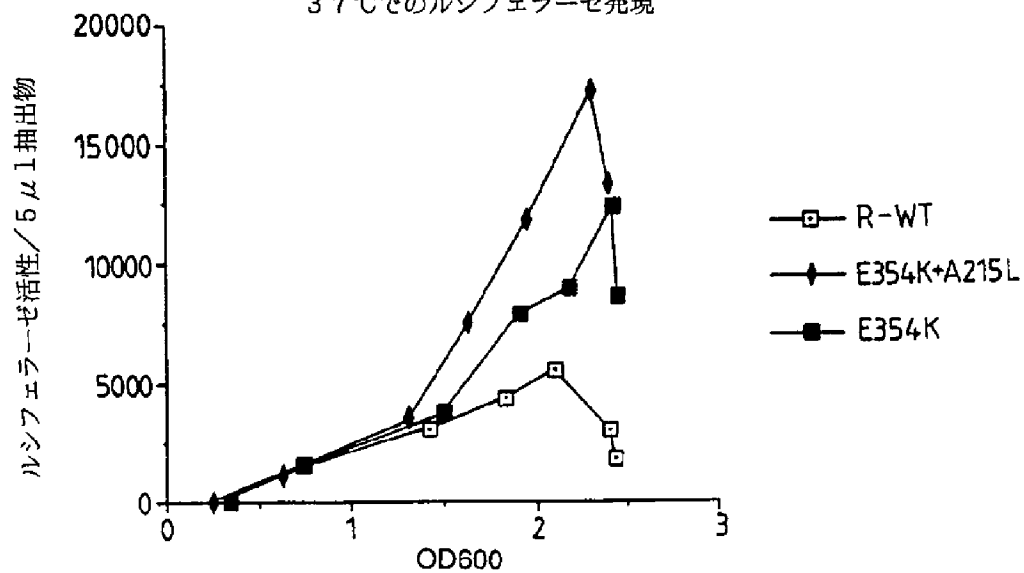
【図12】

Fig.12.

37℃におけるルシフェラーゼの安定性

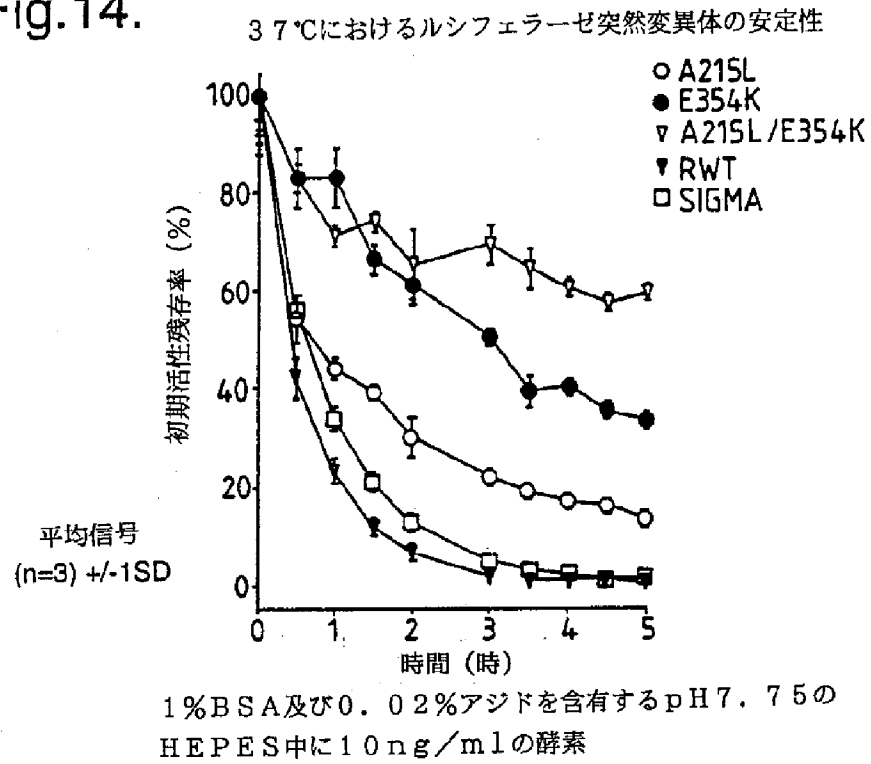
【図13】

Fig.13.

37℃でのルシフェラーゼ発現

【図14】

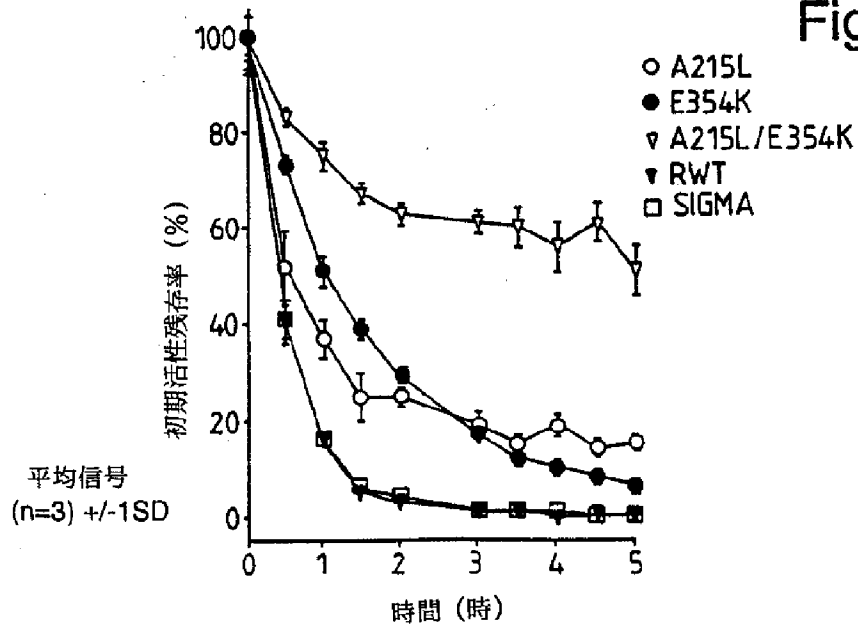
Fig.14.



【図15】

37℃におけるルシフェラーゼ突然変異体の安定性

Fig.15.



1%BSA及び0.02%アジド、2mM EDTA及び2mM DTTを
含有するpH7.75のHEPES中に10ng/mlの酵素

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. nat. Application No. PCT/GB 95/00629		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/53 C12N9/02 G01N33/50 C12Q1/68 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.	
X	EMBL Database, Accession No.: X65316, Identification: CVPGEMLUC, Promega cloning vector pGEM-luc see bp 693-695 ---	1-5, 7-13, 15, 16, 22
X	EP, A, 0 524 448 (KIKKOMAN CORPORATION) 27 January 1993 cited in the application see the whole document -----	22
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 July 1995	Date of mailing of the international search report 01.08.95	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Espen, J	

...information on patent family members

PCT/GB 95/00629

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0524448	27-01-93	US-A- 5229285 JP-A- 5244942	20-07-93 24-09-93

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 Q 1/68		0276-2J	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50		9282-4B	C 1 2 N 5/00	B
// (C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 N 9/02				
C 1 2 R 1:19)				
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,				
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M				
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG				
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,				
TD, TG), AP(KE, MW, SD, SZ, UG),				
AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, C				
H, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB				
, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,				
LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, M				
W, MX, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU				
, SD, SE, SI, SK, TJ, TT, UA, US,				
UZ, VN				
(72)発明者 ホワイト, ピーター・ジョン				
イギリス国、ケンブリツジシャー・シー				
ビー・2・1・キュー・テイー、ケンブリ				
ツジ、テニス・コート・ロード、ユニバー				
シテイ・オブ・ケンブリツジ(番地なし)				
(72)発明者 マリイ, ジェイムズ・オーガスタス・ヘン				
リー				
イギリス国、ケンブリツジシャー・シー				
ビー・2・1・キュー・テイー、ケンブリ				
ツジ、テニス・コート・ロード、ユニバー				
シテイ・オブ・ケンブリツジ(番地なし)				
(72)発明者 スキレル, デイビッド・ジェイムズ				
イギリス国、ウイルトシャー・エス・ビー				
ー・4・0・ジェイ・キュー、サリスベ				
リ、ポートン・ダウン、シー・ビー・デイ				
ー・イー(番地なし)				